

(25)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭62-12724

⑫ Int.Cl.
A 61 K 45/02識別記号
ABJ
ADD庁内整理番号
7252-4C

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑭ 発明の名称 IPN-r 含有医薬組成物

⑮ 特 願 昭61-123862

⑯ 出 願 昭61(1986)5月30日

⑰ 优先権主張 ② 1985年5月30日 ② 西ドイツ (DE) ② P3519361.1

⑱ 発明者 マインラット ペテル オーストリア国ウイーン、ベルガツセ 25-28
リツク⑲ 発明者 オスカーホフマン オーストリア国ウイーン、ブツヘンガツセ17-19-41
ベーリンガー インゲ ドイツ連邦共和国インゲルハイム アム ライン (番地なし)
ルハイム インターナシヨナルゲゼルシャフ
ト ミツト ベシユレ
ンクテルハフツンク

⑳ 代理人 弁理士 渋村 照 外2名

明細書
切替書の記載(切替に変更なし)

1. 発明の名称

IPN-r 含有医薬組成物

2. 特許請求の範囲

- (1) 骨の生成および分解に際して生じる過程を調節する IPN-r 含有医薬組成物
- (2) 炎症または非炎症起原(変性疾患)の全身的または局所的骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (3) 病理学的骨喪失の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (4) 骨組織の局所的または全般的分解によつて生じる骨疾患治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (5) 骨吸収の増大を招く過程を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (6) 骨にかけたプロスタグラジンの内因性合成分を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (7) 骨にかけたプロスタグラジンの合成にはと

んどまたは全く骨害作用を示さない非ステロイド性抗炎症剤と配合した、プロスタグラジンの内因性合成分および骨軟化活性を阻害する特許請求の範囲第1項および第2項のいずれかに記載の医薬組成物

- (8) 骨細胞活性を阻害する特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (9) パラソルモンによつて生じるすべての骨異常症、とくに骨性の骨疾患の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (10) パラソルモン誘発骨吸収の抑制と、自己免疫応答によつて生じる系球体腎炎の場合同時に免疫抑制活性による、進行性腎不全の付加的治療剤としての特許請求の範囲第1項から第9項までのいずれかに記載の医薬組成物
- (11) すべての型および段階の骨軟化症治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物
- (12) IPN-r 単独またはジリン酸塩と配合したバージエット骨形成用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

03 リウマチ型の疾患、とくに慢性関節リウマチ（一次性慢性多発関節）の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

04 骨折が増大する組み上げ構成物の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

05 プロスタグランジン分成脂質（活性脂質）における過カルシウム血症の治療用の特許請求の範囲第1項記載の医薬組成物

06 骨疾患の治療に付し活性化せず公知物質を配合した特許請求の範囲第1項から第15項までのいずれかに記載の医薬組成物

3. 告白の詳細な説明

生きている骨組織は一定の再構築過程をくり返していて、生理的条件下には新形成と分解が平衡を維持している。骨化骨の新形成（骨形成）は主として骨芽細胞の活性によって決定される。これらの骨芽細胞の機能は、活性骨マトリックスの構成因子——主としてア型コラーゲン——の合成と分離であつて、これはついでヒドロキシルアバタイトの沈着によって活性化される。骨化骨の分解

高齢者にあらわるが、この喪失が年齢から考えられるよりはるかに大きいものである。骨粗鬆症はもつとも雄性の高齢の骨疾患と考えられる。

とくに男性の高齢者にこの疾患が多い。たとえば本國における調査では65歳を超えた全女性の25%はこの疾患に罹患しているといふ¹⁵⁾。調査に計算して、西ドイツでは患者は約300~400万人と考えられる。骨壊失の結果、骨柱、大脳骨頭部または四肢、すなわちとくに大きな应力がかかりやすい身体部位の骨折が増大する。これらの骨折は直症で、運動制限や跛行が残ることが多い。代表的な変化は骨柱の骨柱である。これは患者の運動能を著しく阻害する。常に痛みがあるのに加えて、屈曲した姿勢は、心肺および骨骼筋にも悪影響を与える。

この疾患には、カルシウムレベル、およびカルシウムレベルしたがつて骨の変化や有機骨マトリックスの新形成をも調節する各種ホルモンがとくに関与している。閉経後の婦人で低下するエストロジエンはとくに重要である。

は、多分、甲子（マクロファージ）から骨細胞活性によって形成される多核粗大細胞のよきな破骨細胞によって行われる¹⁶⁾。

骨芽細胞と破骨細胞の活性は、生成過程と分別過程の間の幼細胞を維持する活性な調節機構により、生理的条件下にはたがいに制御されている。調節はホルモン如く、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃、パラシルモンおよび（多分）カルシトニン¹⁷⁾によって行われるのみでなく、各種の局所メタイエーダーおよび組織ホルモン¹⁸⁾、とくにプロスタグランジン¹⁹⁾やまだ同定されていない“カルボリング因子”²⁰⁾によつても行われている。最後に挙げた因子は、破骨細胞活性制限後に骨芽細胞の反応粗大化がみられ、これがたとえば分解の増大が骨形成の活性によつて補償される結果と考えられるところで注目されているものである。この平衡の失調が多くの骨疾患の原因となるとくにそのひとつとして骨粗鬆症を挙げることができる。これは骨失調、すなわち骨吸収量と骨形成マトリックスの喪失を生じるので、主として

各ホルモンおよびメタイエーダーの特異的活性に関するには、パラシルモンおよびビタミンD₃、とくにその代謝物で骨強度が形成される1,25-ジヒドロキシビタミンD₃が一次的に骨芽細胞の活性を調節することが確立されている²¹⁾。さらに、これらは、骨球膜プレカーナーの融合を促進し、したがつて骨組織における破骨細胞数を増加させるようと思われる²²⁾。それらの活性に対する直接的な影響も否定できない。プロスタグランジンも別の機序によつて、破骨細胞の数および活性の増加をもたらすとされている²³⁾。

歴史になつて、インターロイキンおよびリンフォカインがまた、骨再構築過程に特異的な因子を果たしていることが明らかにされた²⁴⁾。マクロファージの活性亢進の骨組織内に形成されるインターロイキン1は骨粗鬆症において骨の分解を促進するが²⁵⁾、その活性の一端は骨吸収活性を有するプロスタグランジンの内因性合成分を制御することによると考えられる²⁶⁾。いわゆる“破骨細胞活性化因子”(OAF)は、インターロイキン1を含めた各

骨形成に対する影響として、リンパ球によつて產生されるリンフォカインである。DAFはまた、プロスタグランジンによつて产生される骨軟化活性を有する。

骨形成症の治療は、現在では、骨吸收の喪失を回復することが事实上不可能なので難しい。フルオライドによる骨形成についての論争がある。したがつて、治療の方向は、骨の分解過程を抑制せば骨の産生まで低下させ、疾患の進行を阻止することに向ければれている。

しかしながら、疾患の予防も必要である。米国では、女性は最初からカルシウムを十分摂取が求められる。摂取するように指導されている。

しばらく前から、ペプチドホルモンであるカルシトニンも、骨形成を阻害できるといわれてきた。これに、既存細胞に対するパラソルモンの作用を加えますか。また元々自身、破骨細胞に対する抑制作用をもつようと思われるが、しかしながら、カルシトニンによる治療は少からず、骨の喪失が止むかなく進行している患者にのみ阻害されて

骨形成できる(上記文献参照)。

ア-インターフエロンは、既存細胞によつてもたらされる骨軟化活性の分離を促進することが期待されていたのである。したがつて、骨軟化阻害に対する阻害作用は、全く高くべきことである。

本発明は、骨形成および分離の際に生じる過程に対する調節作用をもつ医薬組成物の製造のためのア-IPNの利用に関する。

本発明は、病理的な骨喪失を導く過程を、高くべきことにIPN-Tが阻害できることをはじめて示すものである。これは、プロスタグランジンシテターゼ複合体(シクロオキシゲナーゼ系)とア-インターフエロンの相互作用により、骨における骨軟化活性プロスタグランジン類の内因性合成を一次的に抑制することにより達成される。カルシトニンにはこの作用はない。

骨におけるプロスタグランジンの合成の阻害には、高くべきことに、IPN-Tに特異的な作用である。このような作用はIPN-Tにもメビキノン、カルシトニンに類似の第二の作用(7)に、パラソルモン

いる。さらに、カルシトニンの性質に生体が反応するのは一時期のみで(エスケープ現象)、組られた期間のみ活性を行なうのがよいようと思われる。

したがつて、本発明の目的は、骨喪失によつて生じる骨形成過程の治療用新剤を提供することである。

本発明は、よくべきこと、ア-インターフエロンが、骨形成および分離の際に生じる過程に対するきわめて強力な調節作用を行なうことを発見し、完成されたものである。

免疫インターフエロンとも呼ばれるア-インターフエロン(IPN-T)は、インターロイキン1と同様、リンパ球が予め感染された状況によつて特異的にまたは非特異的に刺激されたら、リンパ球上で生成されるので、1種のリンフォカインとみなすことができる。ヒト免疫球蛋白液中でIPN-Tは多能性細胞(多能性細胞)の生成を促進するので、IPN-Tは抗体産生細胞の増殖を促進できるものと推測された。さらに、IPN-Tは、それ自身、骨軟化活性を発現するマクロファージ

によって刺激される破骨細胞活性の阻害がある。しかしながら、このIPN-Tの作用は病変部の骨形成のみ認められる。このカルシトニン様活性は、TSHとHGHなどがたとえば、ヒト白血球インターフエロンが蛋白質においてPTH・誘導骨吸収を阻害できることを明らかにしていることから、他の型のインターフエロンにも同様に認められるものであろうと思われる。

ア-インターフエロンによるプロスタグランジン合成の阻害は、これまでインターフエロンはプロスタグランジンの合成を刺激するうとする方が考えらかたことからも、全く高くべきことである。たとえば、およびア-インターフエロンによる治療中に起こる発熱は、現下部におけるPGE₂濃度の上昇に由来するとされていることなどがである。

この骨軟化に対するア-インターフエロンの高くべき作用は、そのシクロオキシゲナーゼ系に対する特異性によつて説明されるものと想われる。プロスタグランジンシテターゼ複合体の阻害特

異性の差については古くから知られている。竹では、この研究報告は IPN-βや IPN-γでは感作を受けないようである。すでに述べられている結果（たとえば 4）とは別に、上記の JIJKI と Hamilton の研究例で、T-インターフェロンは筋膜骨吸収に向むき効果を与えたかつたという事実によつても、これが示されているように思われる。詳しき合併症の感受性の差を示す他の例は、C-243 細胞からのマウスインターフェロンがマウスでの局所性骨移植に与える影響を検討した KLIBANOFF らの実験にも認められる。使用したインターフェロンが骨あるいは軟膜下品のアロスタグランジン合成就抑制したとしたら期待されるよう、このインターフェロンによる骨軟化症の所見は得られていない。

本発明の他の目的は、病理学的変化した局所性または全身性の骨分離によつて生じる疾患、たとえばすべての骨および皮膚における骨粗鬆症の治療のための活性物質として T-インターフェロンを含有する医薬組成物の使用にある。

骨症に多くの疾患で良い効果を示していること、ということを思い起こせば、骨粗鬆症の治療にとくに有利であろうと思われる。しかしながら、すでに述べたように、カルシトニンは PG の合成に作用せず、その活性の強度は異なるものである。

これらの点から、各症例ごとに、2つの物質のいずれが有利に使用されるか、また両者とも使用できるかを決定できる可能性が生じる。

IPN-γによるアロスタグランジン合成就抑制は、骨再構築過程において、IPN-γがインターロイキン 1 や破骨細胞活性化因子 (OAP) の对抗物であることを示している。この性質は、その合成が各種の炎症メディエーターにより、リウマチ型疾患とくに慢性関節リウマチや類似の疾患において少なからず OAP によって制御されているアロスタグランジンの骨軟化症性が、これらの疾患において認められる骨筋の破壊に寄与していることから、治療的にきわめて重要である。したがつて、本発明は、本発明の薬剤のリウマチ型の疾患とくに慢性関節リウマチへの使用をも包含する、

老人性骨粗鬆症の原因および発病に関してはほとんどわかつていなが、分離過程の比的的緩慢が骨疾患の病理学的変化を招くという考え方¹⁵⁾が広く受け入れられている。骨粗鬆症の患者が、骨吸収ホルモン PTH や 1,25-ジヒドロキシ D₃ の血清レベルに向むき度を示していないという事実は異くべきことである。したがつて、骨分離速度の増大は一次的に局所性因子の影響に由来するものと推測される。これを支持するものとしては、老人性骨粗鬆症の患者の骨生出で、正常人よりも高い PTH₁₋₈₄ 活性を認めたという ASIKI¹⁶⁾らの研究がある。FUJIKURA¹⁷⁾は、骨粗鬆症の患者で T-ヘルバーリンバ球と T-サブレツサーリンバ球の比が変化していることを見出し、骨粗鬆症には免疫調節の障害の可能性があると結論した。これは、免疫調節因子であるインターロイキン 1 や上記の破骨細胞活性化因子が PG 合成の調節因子である点で直結である。またむけた T-細胞に対する IPN-γ の強くべき作用は、IPN-γ がカルシトニンと同様に骨吸収に寄与し、このホルモンが免疫骨粗

IPN-γ による治療は、非ステロイド性の抗炎症剤（たとえばインドメタシン）による相当する治療に比べてきわめて有利である。それは患者が他の治療においても（たとえば骨軟化症においても）同時に PG 合成の阻害作用を示すために重複的副作用（急性胃腸）を生じるからである。しかしながら、多くの非ステロイド性消炎剤は PG の合成に対してわずかな阻害作用を示すのみであり、これらは、T-IPN の骨における PG 合成に対する選択性的作用により T-IPN と有利に配合できることが証明できる。いずれにしても、インターフェロン治療が一次性慢性的多関節炎（慢性関節リウマチ）の治療に何による効果を示すかを判定することは益しい。この疾患では各種の自己免疫現象が認められ、IPN-γ の免疫調節作用がそのどれに効果を示すかは十分研究されていないからである。使用する用法により、IPN-γ は B-リシンバ球による免疫グロブリンの産生に抑制作用と制御作用の両者を示す。各種免疫疾患において、患者の血清にインターフェロンが増加していることも挙げてあ

る、しかしながら、これらの IFN 活性は IFN- α よりもむしろ IFN- β の変化に加すべきものと思われる。細胞によつて与えられる免疫に関するでは、一般的に IFN- α は T-リシンパ球の増殖に対する抑制作用を示し、細胞性免疫の現象たとえば移植における拒否反応または腫瘍型の過敏反応は抑制し、これらは PCP の治療には有利であろうと思われる。一方、IFN- α はある種の条件下には細胞の免疫活性を刺激することもある。

すでに知られている細胞生産の抑制能に加えて、骨におけるプロスタグランジン合成の IFN- α による抑制能は、細胞自体がプロスタグランジンを産生し、骨におけるプロスタグランジン合城を抑制するのである。骨への細胞や骨の分解の原因となる細胞の活性にはいずれにしても有利であろうと思われる。

骨の形成および分解の際に起こる過敏に対する明らかにされたア-インターフェロンの効果は、骨形成の阻害や骨吸收の増大によつて生じると考えられる炎症性または非炎症性起源（炎症疾患）

その他の活性能様による付加的活性を有するので、カルシトニンまたは他の骨疾患治療として知られている他の薬剤と配合することも可能である。

本発明の薬剤は、たとえば、若年者にもしばしば見られ、一般的には皮膚腫瘍とも呼ばれている皮膚の骨吸收のような、骨喪失が進む細胞および骨疾患の治療にもきわめて適している。

本発明の薬剤は、ヒト患者または動物に全身的にまたは局所的に、たとえば皮膚内に投与できるが、一般的には、経口、局所、非経口およびバルサル投与される。理論的には、ア-インターフェロンの血漿/組織レベルの増大をもたらすすべての種類の投与が適している。たとえば、ア-IFN の投与には溶液が便利であるが、他の剤型とすることも可能である。

本発明による利用には、減くべきことに、少量のア-IFN でも十分である。投与量および用量比は、現在、臨床成績でア-IFN に適用されている量と同様である。投与量は投与部位によつて変動する。

投与量は、ア-インターフェロンの血漿/組織

の全身性または局所性骨疾患の治療に使用される医薬組成物のきわめて活性な細胞としてア-インターフェロンを位置づけることになつたのである。

これらの疾患には、すでに述べたものほか、パラソルモンによつて生じる各種の骨異常症、とくに骨性の骨疾患が包含される。進行性骨不全においてパラソルモンによつて生じる骨吸收が知られている。これらの疾患の中には、自己免疫系によつて起こる多発性骨炎がある。とくにこれらの症例には、ア-IFN は免疫抑制作用とともに骨吸收性物質として、とくに適している。本発明の特質は、骨吸收を阻害し、自己免疫反応に効果的に影響を与える。

同様に、他の骨異常症、バージエット病も、本発明の薬剤で治療できる。

さらに、ア-IFN は、カルシトニン治療過敏で応答がなかつた症例および/または免疫反応を生じた症例すべてに適当に使用できることという利点がある。

本発明の薬剤、ア-IFN はすでに述べたように、

レベルの効果的な上昇を達成できるようになるとべきことが条件となる。

本発明の薬剤は、慣用の医薬用賦形剤および/またはピークルおよび/または安定化剤を含有させることができる。

使用できる安定化剤の例としては、アミノ酸、ジー、トリシおよびテトラペプチド、既知またはアルブミンを挙げることができる。

本発明の技術分野における熟練者には、多くの賦形剤、ピークルおよび安定化剤がよく知られたところであろうし、また、本発明の薬剤をそれらといかに処方するかも熟知するところであろう。これらに関しては、E. R. Martin 著の Remington's Pharmaceutical Sciences の特質および処方の配列を参照されたい。

次に、本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明を例示するためのものであつて、いかなる意味でも本発明を限定するものではない。モデルで得られた結果は、すべての哺乳類動物にましかえることができる。

摘要および方法

出典えマウス IPN-7 (大腸癌より) (Ernst Boehringer Institute fur Arzneimittelforschung, Vienna) の比活性は 1 mgあたり 1.3×10^7 抗ウイルス単位であつた。IPN-7 は RPMI メジウムに溶解し、使用時まで高濃度低温での凍結状態に保存した。IPN-7 および (ニューキヤツスル特ウイルスで誘発し、テオフィリンで薬理活性した Ehrlich 頭水細胞より) は Endo Biochem, Inc 社 (U. S. A.) の製品であつた (Ernst Boehringer Institute fur Arzneimittelforschung)。バツナム 3-07001 の比活性は 4.4×10^6 U/mg 蛋白質であつた。使用した培養の活性は 6.0000 単位/mg と測定された。比較の目的で使用した合成サケカルシトニン (比活性 100 MRC 単位/mg) は Sanabo 社 (Vienna) の製品であつた。バテソルモンは Bachem 社 (Torrance, California) の合成 L-末端断片 1-34 を使用した。プロスタグランジン E₂ は Upjohn 社の prostaglandin E₂ という名前で製品を使用した。ウシトロンビンは Hoffman

活性した 15% ウマ血清を加えた。ウマ血清 (Gibco) は 65°C で 45 分間不活性化した。完全メジウムを放血罐斗 (0.22 ミクロン, Millipore) を通した濾過した。

24 時間後、培養メジウムを各種添加物とともに変え、ついで計 72 時間までまたは最高 96 時間まで培養を続けた。

骨吸収の程度はメジウム中へのカルシウムの放出を測定して定量した。この目的で、培養メジウム中のカルシウム濃度を、Corning 940 カルシウム分析装置で蛍光滴定法を用い、時間 0, 24, 48, 72 または 96 に測定した。

結果は 6 例の強度骨での平均士平均の標準誤差で示す。各群間の有意差は Student の t-検定で求め、P < 0.05 をもつて有意とした。

例 1強度骨吸収に対する IPN-7 の影響

メジウムに何も添加物を加えないで骨を培養しても、メジウム中のカルシウム濃度はわずかに増加し、これから骨はたえず吸収されていることが

LaRoche 社の topostatin や、またインドメタシンは Sharp & Dohme 社の製品をそれぞれ使用した。

マウス新生仔の頭蓋骨は、細胞培養でかなり長期間 (96 時間までまたはそれ以上) 保持できる。実験法の詳細については多くの研究者が報告している (8, 12, 13)。使用した特定のマウスは、4~6 日齢の SPF マウスであつた (Institute fur Versuchstierzucht of Vienna University, Hinberg)。この種は、HIM : OF と表示する。

頭蓋骨は滅菌条件下に調製する (ラミナーフロー)。付着した結合組織を圧縮早く除去したのち、骨を試験管中 1.0 ml の培養メジウム (下記参照) 内に移す。50% O₂, 45% N₂ および 5% CO₂ で処理したのち、試験管を密封し、ついで細胞培養の全期間を通じ、回転ドラム中 (回転速度: 20 回転/時)、37°C でインキュベートする。

培養メジウムは、MA Bioproducts 社 (Walkerville, Md) 製のダルベッコ改良イーグルメジウム (DMEM) とした。このメソウムに L-グルタミン酸を 1.4% の濃度に加え、また加熱して不活

わかる (第 1 図参照)。この理由はプロスタグランジンの内因性生成にある (14, 15)。なお、この基礎液は、第 1 図から明らかのように、プロスタグランジン合成の強力な阻害剤であるインドメタシンによって抑制することができる。

培養メジウムに 100 U/mg の濃度の IPN-7 を加えても、カルシトニンの阻害作用の程度に相当し、またインドメタシンの抑制効果に匹敵する基礎液の阻害が認められる (第 1 図)。結果を第 1 表にまとめる。

第1表

		メジカム4104 ^{**} mmol/l (5%の牛の平均血漿濃度)		
試験物	時間	24h	48h	72h
非処置		1.40 ± 0.06	2.02 ± 0.07	1.86 ± 0.09
uCT (salmon calcitonin) (20 MU/ml)		1.64 ± 0.02	1.70 ± 0.02	1.65 ± 0.03
Indomethacin (5×10 ⁻⁷ M)		1.63 ± 0.01	1.61 ± 0.02	1.55 ± 0.06
IPN-T (100 U/ml)		1.80 ± 0.05	1.69 ± 0.02	1.52 ± 0.04

れる。トロンビンの活性の正確な機構はわかつてゐないが、その蛋白分解活性（多分、他のプロテアーゼの活性化）により、複数ホリビドからアラキドン酸を切り離すホスホリバーゼを活性化できることによると推測されている。その結果、シクロオキシゲナーゼ系の蓄積がたえず供給されることになり、各種プロスタグランジンの内因性合成がたえず制限されやすい。第2表および第2図は、IPN-Tがトロンビン誘発骨吸収を完全に抑制することを示している。先端インターフェロンの作用は、インドメタシン 5×10^{-7} Mの作用効力に全く匹敵するものである。

72時間試験は、用量-活性曲線の挿入時の作成で使用した。

第2表

トロンビン誘発骨吸収に対するIPN-Tの効果

また、本発明者らは、培養骨中の内因性プロスタグランジン産生にIPN-Tが影響を示すかどうかを明らかにすることを試みた。そのためには次の試験方法を開発した。すなはち、培養メジカムにトロンビンを加えると、インドメタシンによって誘導される骨吸収が増強され、トロンビンは明らかに内因性PG合成を制限するという現象に出发し、72時間の培養時間中ににおけるマックス骨吸収の吸収に対する種々の濃度のトロンビンの影響を検討した。第2表と第8図から明らかのように、培養メジカム1 mlあたり14-42単位の濃度のトロンビン濃度でカルシウムのメジカム中への最高放出が起こり、トロンビンによる吸収過程の割合の程度は各試験間で比較的わざかに変動を示すのみでなく、各試験の比較で測定されたカルシウム放出の絶対値には高い再現性があることがわかつた。したがつて、この試験は骨にかける20合成の阻害剤の影響をみるのにとくに適していると考えら

第2表

		メジカム4104 ^{**} mmol/l (5%の牛の平均血漿濃度)		
試験物	時間	24h	48h	72h
トロンビン 非処置		1.66 ± 0.03	1.63 ± 0.07	1.61 ± 0.07
Thrombin 1 U/ml		1.67 ± 0.03	1.81 ± 0.09	2.01 ± 0.31
Thrombin 7 U/ml		1.81 ± 0.06	2.30 ± 0.11	3.02 ± 0.55
Thrombin 14 U/ml		2.13 ± 0.08	2.66 ± 0.11	3.56 ± 0.21
Thrombin 21 U/ml		2.21 ± 0.03	2.69 ± 0.05	3.63 ± 0.11
Thrombin 28 U/ml		2.28 ± 0.02	2.71 ± 0.06	3.61 ± 0.12
Thrombin 42 U/ml		2.30 ± 0.05	2.72 ± 0.10	3.52 ± 0.12

図3表

試験液	24h		48h		72h	
	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)
無処理	1.72 ± 0.03	1.71 ± 0.02	1.63 ± 0.04			
IPN-T (100 U/ml)	1.60 ± 0.01	1.59 ± 0.02	1.52 ± 0.04			
PUK ₂ (5 × 10 ⁻⁷ M)	2.04 ± 0.03	2.60 ± 0.05	3.60 ± 0.13			
POE ₂ (5 × 10 ⁻⁷ M) ⁺						
IPN-T (100 U/ml)	1.95 ± 0.04	2.40 ± 0.01	3.10 ± 0.06			
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06			
Thrombin (14 U/ml) + IPN-T (100 U/ml)	1.99 ± 0.05	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06			
Arachidonic acid (5 × 10 ⁻³ M)	1.92 ± 0.05	2.35 ± 0.10	2.85 ± 0.27			
Arachidonic acid (5 × 10 ⁻³ M) ⁺						
IPN-T (100 U/ml)	1.92 ± 0.09	2.01 ± 0.05	1.93 ± 0.03			

活性液にも、またアラキドン酸鉄溶液液にも有意な影響を与えることなく目下べきである（図3図、図4図、図4表、図5表参照）。

99-3

POシンターゼ複合体に対するIPN-Tの影響

まず、本発明者は、IPN-Tがトロンボン活性の他のプロテアーゼもしくはホスホリバーゼの活性化に影響するかどうか、または免疫インターフェロンが直鎖プロスタグランジンシンターゼ複合体と相互作用するかどうかを確立することを試みた。この目的で、培養骨中のプロスタグランジン合成を培養メジウムへのアラキドン酸添加によって制御した。この脂肪酸は前述のように、シクロオキシゲナーゼ反応により様々なプロスタグランジンに変換される。その骨軟化活性（第2図）から、培養骨中でもプロスタグランジンの合成に内因性アラキドン酸が使われることは明らかである。IPN-Tは、アラキドン酸によって制御された脂肪培養液中の骨軟化活性を完全に遮蔽でき（第2図）。これらの結果は、IPN-Tが骨中のプロスタグランジンシンターゼ複合体に直接作用できることを示している。

これに因縁して、カルシトニンはトロンボン

図4表

試験液	24h		48h		72h	
	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)	無処理	(5%の骨の半胱酸鉄濃度)
無処理	1.74 ± 0.04	1.72 ± 0.05	1.64 ± 0.08			
Thrombin (14 U/ml)	2.11 ± 0.07	2.62 ± 0.05	3.62 ± 0.06			
Thrombin + c ₁ (20 μg/ml)	1.82 ± 0.01	2.08 ± 0.08	2.82 ± 0.19			
Thrombin (14 U/ml) + IPN-T (100 U/ml)	1.93 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.92 ± 0.06			

図5

メジカムリウム³⁴, 0.004/1
(5頭の骨の半端骨吸収量)

試験物	24h	48h	72h
非処置	1.78 ± 0.03	2.01 ± 0.04	1.85 ± 0.04
AA (5x10 ⁻³ μ)	1.95 ± 0.03	2.41 ± 0.11	2.96 ± 0.28
AA (5x10 ⁻³ μ) ⁺ GCT (20mU/ml)	1.72 ± 0.02	2.13 ± 0.05	2.78 ± 0.20
GCT (20mU/ml)	1.64 ± 0.02	2.18 ± 0.06	1.65 ± 0.03

する作用力にかかる。PTH 誘発骨吸収に対するカルシトニンの作用を示すことが明らかにされた。ナカルシトニン 2.0 mU/24h の PTH 活性に対する作用を比較のため記示す。

図4

POE₂ および PTH によって制限された骨吸収に対する IPN-T の影響

IPN-T がプロスタグランジンの合成を抑制する事が確立されたので、培養メジカムリウム中に加えた POE₂ の骨吸収活性に対する IPN-T の影響は薄いものであろうと予測された。実際、第2図に示すように、IPN-T は POE₂ の骨吸収活性にはわずかな影響を与えるのみであった。しかしながら、この阻害作用は、内因性プロスタグランジン合成によってもたらされる基礎骨吸収の相当する抑制より大きかつたことは注目に値する。プロスタグランジン合成の阻害に加えて、IPN-T がプロスタグランジンの一貫した作用に影響しないかをみるために検討を行つた。これらの作用にはとくに破骨細胞の活性化が含まれる(16)。

バランソルモントも、プロスタグランジンとは独立の機構で、無酸培養時に破骨細胞の数および活性を増大させる(17)。試験結果を第5表に記し図示す。IPN-T は、プロスタグランジン活性に対する

図6

メジカムリウム³⁴, 0.004/1
(5頭の骨の半端骨吸収量)

試験物	24h	48h	72h	96h
非処置	1.85±0.02	2.04±0.04	2.06±0.06	2.03±0.06
IPN-T (500 μU/ml)	1.89±0.03	1.89±0.04	1.84±0.03	1.78±0.03
PTH (10 ⁻³ μ)	2.08±0.05	2.75±0.07	3.84±0.06	4.51±0.16
PTH (10 ⁻³ μ) ⁺ IPN-T (100U/ml)	2.07±0.02	2.55±0.06	3.49±0.11	3.82±0.17
PTH (10 ⁻³ μ) ⁺ IPN-T (250U/ml)	2.05±0.04	2.39±0.07	3.12±0.16	3.40±0.25
PTH (10 ⁻³ μ) ⁺ IPN-T (500U/ml)	2.08±0.05	2.36±0.01	2.94±0.05	3.19±0.09
PTH (10 ⁻³ μ) ⁺ GCT (20mU/ml)	1.65±0.01	2.15±0.05	2.45±0.10	2.52±0.13

図5

筋膜とエビ刺激収に対する IPN- α , β の影響
アラキドン酸エビシジンせんに対する作用がとくに
IPN- α に特異的なものか、または他の型のインターフェロンにも認められるものかを確立するため
に、一連の試験を行、タ-インターフェロン
(IPN- α , β)についても反復して実施した。第6
図に示すように、この型のインターフェロンは、
IPN- γ とは異なり、トロンビンまたはアラキドン
酸脂質収に対する作用を示さない。
用いた濃度 (100 U/ μ メジカム) では、PTH
脂質収に対する IPN- α , β の阻害も認められ
なかつた(図7回)。結果は以下の2表に示す。

表8

試験物	24h			48h			72h			96h		
	IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	IPN α / β (100 U/ μ ml)	
IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.85±0.03	2.02±0.04	2.04±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08	2.01±0.08
PTH (10 $^{-4}$ U) + IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.88±0.08	2.02±0.10	1.98±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12	1.92±0.12
PTH (10 $^{-4}$ U)	2.04±0.04	2.78±0.09	3.91±0.22	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39	4.42±0.39

表7

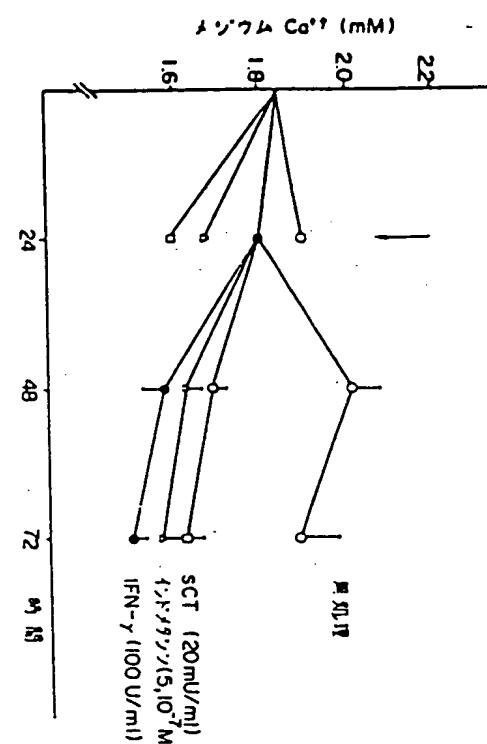
試験物	カルシウム中Ca ⁺⁺ mmol/L ² (5個の骨の平均±標準偏差)		
	24h	48h	72h
非処置	1.85±0.03	2.02±0.04	2.09±0.08
IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.88±0.08	2.02±0.10	1.92±0.12
POE ₂ (5×10 $^{-7}$ U)	1.98±0.05	2.44±0.08	3.15±0.19
POE ₂ (5×10 $^{-7}$ U) +IPN α / β (100 U/ μ ml)	1.96±0.05	2.38±0.06	2.96±0.11
Thrombin (14 U/ μ l)	2.08±0.04	2.50±0.01	3.20±0.06
Thrombin (14 U/ μ l) +IPN α / β (100 U/ μ ml)	2.04±0.02	2.36±0.02	2.64±0.07
AA (5×10 $^{-7}$ U)	2.07±0.05	2.50±0.08	3.15±0.16
AA (5×10 $^{-7}$ U) +IPN α / β (100 U/ μ ml)	2.03±0.04	2.46±0.07	2.84±0.11

4. 図面の簡単な説明

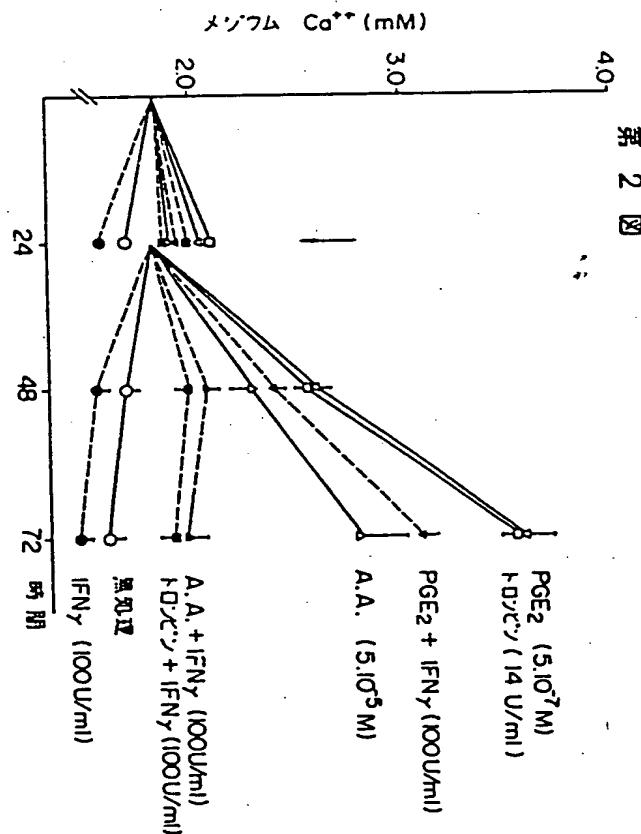
第1回は、マウス新生仔由石井からリカルシウム放出 (脂質収) に対する IPN- γ の影響を示す。第2回は、POE₂、トロンビンまたはアラキドン酸 (AA) によって刺激された骨収に対する IPN- γ の影響を示す。第3回は、培養マウス新生仔頭蓋骨のトロンビン脂質収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第4回は、アラキドン酸 (AA) 脂質収に対するサケカルシトニン (SCT) の影響を示す。第5回は、培養マウス頭蓋骨のパラソルモン (PTH) 脂質収に対する IPN- α , β の影響を示す。第6回は、培養マウス新生仔頭蓋骨の骨収に対する IPN- α , β の影響を示す。第7回は、培養マウス新生仔の頭蓋骨におけるパラソルモン (PTH) 脂質収に対する IPN- α , β の影響を示す。第8回はトロンビン・バイオアッサーで、トロンビン脂質収の時間経過と用酸脂質曲線を示している。
○：对照； ▲：10 U/ μ l； △：70 U/ μ l； □：
140 U/ μ l； 填入回は培養72時間後の、培養1

シウムへのカルシウム放出で測定した。トロンビン $0 \sim 420 \text{ U/ml}$ の用量-活性曲線である。

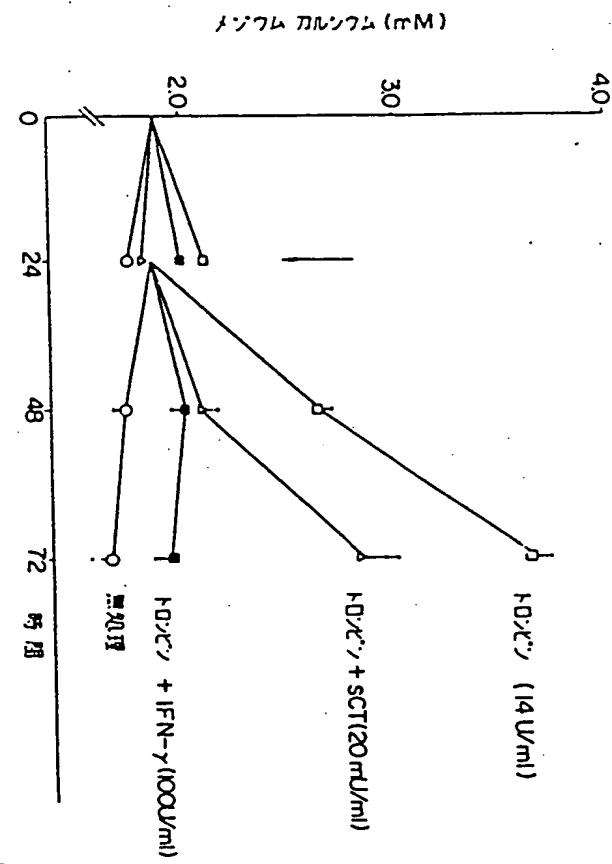
代入活性曲線



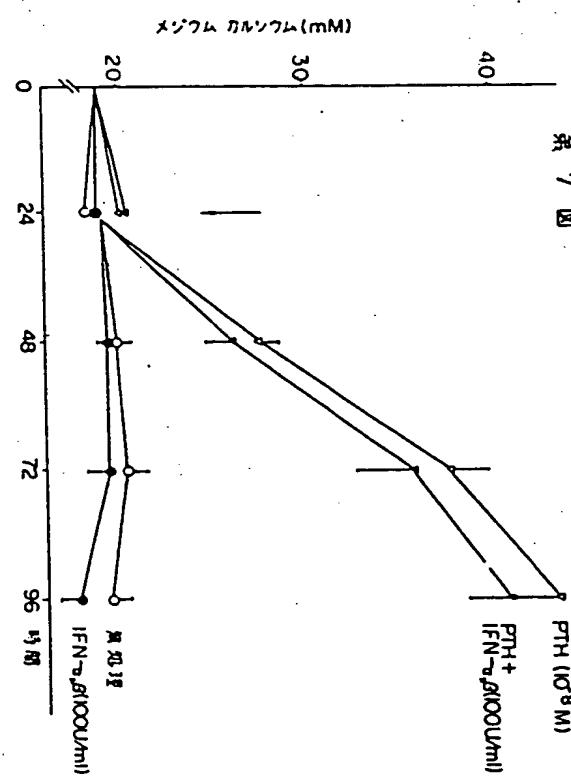
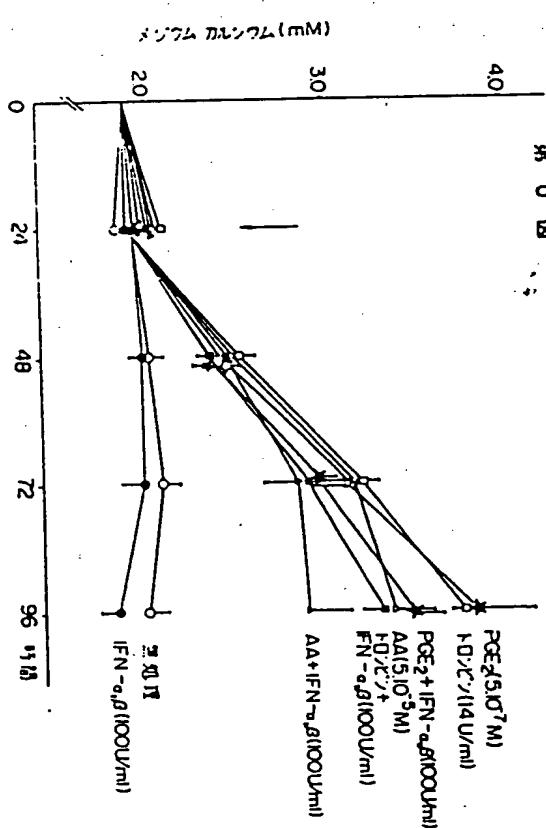
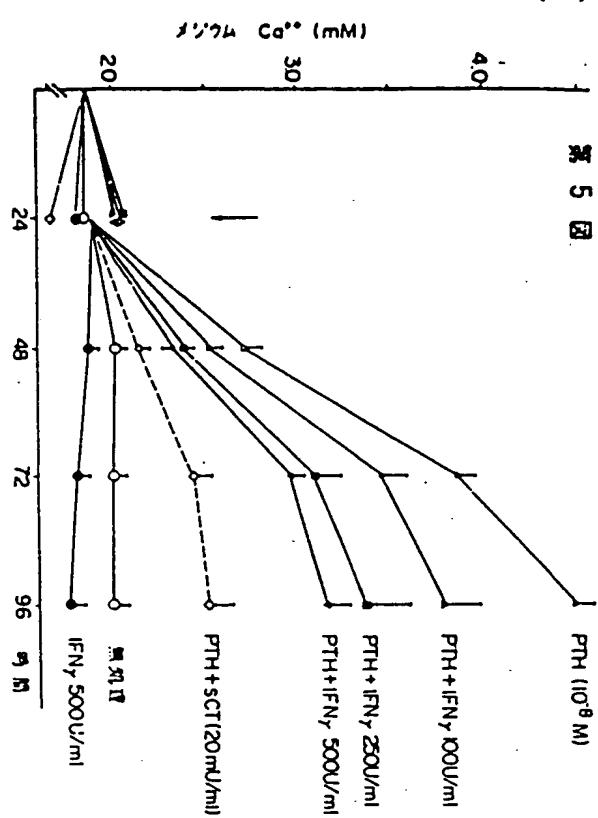
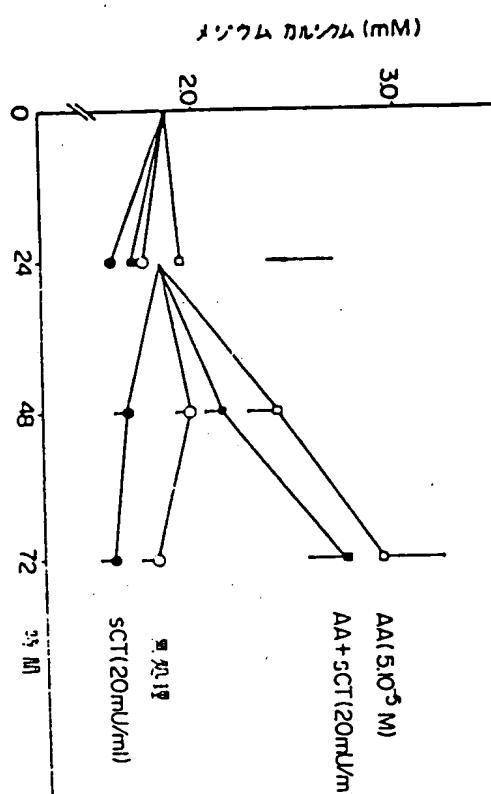
第1図

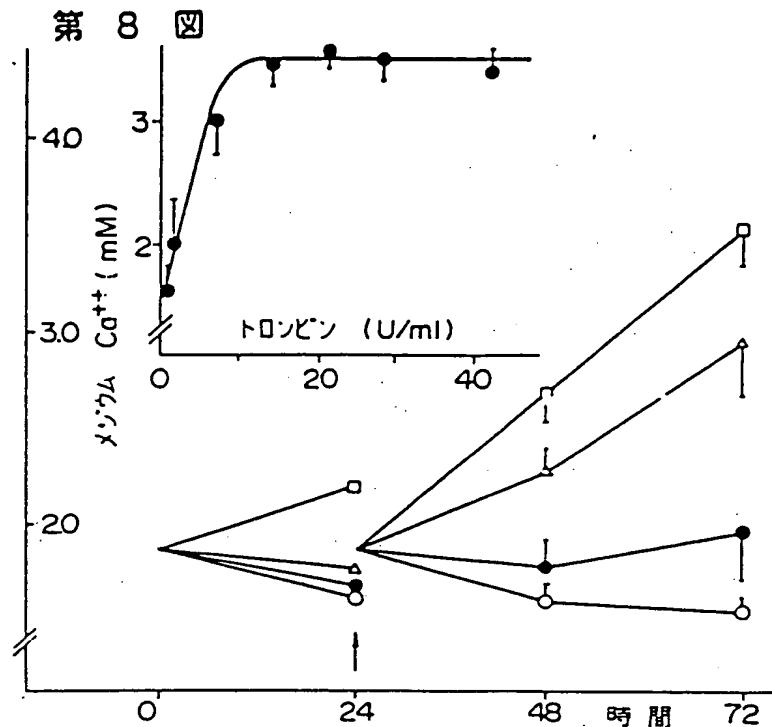


第2図



第3図





手 続 紹 正 書 (方式)

昭和61年 8月11日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許第123862号

2. 発明の名称

I-F-N-T 含有医薬組成物

3. 紹正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 ベーリングー インダストライム インターナショナル
氏名 ダニエルシヤフト ミット ベシュレシクタル
ハーフマン

4. 代理人

住所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング331
電話 (211) 3651 (代表)
氏名 (6669) 渡 村 皓

5. 紹正命令の日付

昭和61年 7月29日

6. 紹正により増加する発明の数

7. 紹正の対象

明細書



8. 紹正の内容 別紙のとおり

明細書の争奪 (内容に変更なし)